

# Progress of Hepatitis B Virus Biomarkers and Detection Methods\*

Liling Zhang<sup>1</sup>, Zhiwei Sui<sup>2#</sup>, Yingying Liu<sup>2</sup>, Jing Wang<sup>2</sup>, Boqiang Fu<sup>2</sup>, Wen Chen<sup>3</sup>, Jiayuan Wang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Guangzhou Institute of Measurement and Testing Technology, Guangzhou

<sup>2</sup>National Institute of Metrology, Beijing

<sup>3</sup>College of Arts and Science of Beijing Union University, Beijing

Email: #suizhw@nim.ac.cn

Received: Sep. 6<sup>th</sup>, 2013; revised: Sep. 17<sup>th</sup>, 2013; accepted: Sep. 22<sup>nd</sup>, 2013

Copyright © 2013 Liling Zhang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Abstract:** Hepatitis B is one of the most common infectious diseases around the world. About 350 million people are infected with hepatitis B virus totally in the world, and 120 million people are infected in China. It is very important to apply biomarker detection for diagnosis, prevention and treatment of HBV. At present, there are many detection methods of HBV based on different biomarkers and principles, and they have different clinic application and detection effects, so the progress of the HBV biomarkers and detection methods is more and more important. This article introduced the physical and chemical characteristics, structure, biomarkers of HBV and the research progress of analytical methods, in order to provide the reference for the clinical detection of HBV.

**Keywords:** Hepatitis B Virus; Biomarker; Detection

## 乙肝病毒生物标志物及其检测方法研究进展\*

张力玲<sup>1</sup>, 隋志伟<sup>2#</sup>, 刘瑛颖<sup>2</sup>, 王晶<sup>2</sup>, 傅博强<sup>2</sup>, 陈文<sup>3</sup>, 王佳媛<sup>3</sup>

<sup>1</sup>广州计量检测技术研究院, 广州

<sup>2</sup>中国计量科学研究院, 北京

<sup>3</sup>北京联合大学应用文理学院, 北京

Email: #suizhw@nim.ac.cn

收稿日期: 2013年9月6日; 修回日期: 2013年9月17日; 录用日期: 2013年9月22日

**摘要:** 全世界约有 3.5 亿人感染乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV), 其中中国有约 1.2 亿人。应用 HBV 生物标志物检测, 对于 HBV 的诊断、防治至关重要。目前我国针对 HBV 的检测方法非常多, 这些检测方法基于不同的 HBV 生物标志物和不同的检测原理, 其在临床上的应用以及检测效果也有所不同, 因此了解 HBV 生物标志物及其检测方法的最新进展就显得更为重要。本文逐一介绍了 HBV 的理化特征、结构、生物标志物以及检测方法的研究进展, 以供 HBV 的临床检测参考。

**关键词:** 乙型肝炎病毒; 生物标志物; 检测

### 1. 引言

乙型病毒性肝炎是最常见的感染性疾病之一<sup>[1,2]</sup>。

\*基金项目: 科技支撑项目计划(2013BAK12B05), 公益性科研院所基本科研业务费专项(AKY1219)。

#通讯作者。

全世界约有 3.5 亿人感染乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV), 而中国就有约 1.2 亿人。中国作为乙型肝炎的高流行区, 占全球 HBV 表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)总携带率的近 50%, 其

中 60% 的人受过 HBV 的感染, 在某些人群中甚至高达 79%<sup>[3]</sup>。乙型肝炎病毒(HBV)属嗜肝 DNA 病毒, 感染乙型肝炎不仅会引起急性肝炎, 还可能致慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌。HBV 可通过多种途径感染人体, 引起肝病的传播。中国也是肝癌高发区, 因而对 HBV 的防治已成为中国健康与传染病控制中的首要问题。

目前认为血清 HBV-DNA 是 HBV 复制活动最直接和可靠的标志, 因此, 乙型肝炎病毒感染诊断的检测方法主要是血清学标志物的检测和 HBV-DNA 含量的检测。HBV-DNA 是直接反映 HBV 复制传染性的指标, 为传染性的判断及疗效观察提供确切依据; 而 ELISA 法检测血清中的抗原抗体是诊断乙型肝炎的常规方法<sup>[4]</sup>, 其检测结果反映了人体对 HBV 的免疫状态。两种方法各有利弊。因此正确地了解和研究 HBV 生物标志物在临床的应用和最新的进展, 对 HBV 的感染诊断、治疗等是非常重要的。

## 2. HBV 的理化特征

HBV 具有明显的嗜肝性。HBV 的外膜为脂蛋白结构, 约含 25% 脂质和 75% 糖蛋白, 后者主要成分为 HBsAg。HBcAg、HBsAg 分别在胞核及胞浆中合成后, 在胞浆中组装成完整的 HBV 颗粒, 最后释放入血。其他细胞如胆管上皮细胞、肝脏上皮细胞、精子、外周血单个核细胞 PBMC, 细胞及皮肤、胰、肾等组织中均可检测到 HBV 标志物。90% 肝细胞中 HBV 阳性颗粒分布于胞浆, 5% 在胞核, 5% 两者兼而有之。HBV-DNA 在肝细胞中呈弥漫性、小叶性、局灶性等多种分布形式, 以局灶性分布为主。完整的 HBV 颗粒对热、低温、干燥、紫外线等外界因素的抵抗力很强, 在 60℃ 中可耐受 4 h, 37℃ 可存活 7 天。但 100℃ 加热 10 min、0.5% 过氧乙酸、0.3% 漂白粉、0.2% 新洁尔灭可杀灭。

## 3. HBV 的结构

HBV 是目前人类感染的最小的双链 DNA 病毒, 是一环状的部分双螺旋结构, 长约 3.2 kb。其中的 2/3 为双螺旋结构, 1/3 为单链, 这就是说, DNA 中的 2 条链不等长。长链的 5' 端与 3' 端无共价连接, 而是与一种蛋白质共价相连。长链的 5' 端以 250~300 对碱基互补结合。长链为负链, 短链为正链。短链的长度视

病毒而异, 一般长约 1.6~2.8 kb, 约为长链的 2/3。短链之间的空隙可由病毒颗粒中的 DNA 聚合酶充填。其编码区基本有广泛的重叠。不同病毒株的 L(-) 链均含有 4 个开放读码框, 分别称为 S, C, P, X 区。

### 3.1. S 基因

S 区又分为 S 基因, preS1 基因和 preS2 基因 3 段, 它们读码框相位相同, 连续串连排列, 分别编码 S 蛋白、preS1 蛋白和 preS2 蛋白。其中 S 蛋白称为主要蛋白或小蛋白, preS2+S 蛋白称为中蛋白, preS1 + preS2 + S 蛋白称为大蛋白。S 基因区所编码的 3 种产物都参与 HBV 病毒颗粒的装配, 其中 S 蛋白是病毒外壳的主要蛋白。S 基因位于 155~832 位核苷酸, 长 678 bp, 编码 226 个氨基酸大小的包膜蛋白即 HBsAg<sup>[5]</sup>。

#### 3.1.1. preS 多肽与 HBsAg 的免疫原性

S 基因区所编码的产物可刺激机体产生中和性抗体或称为保护性抗体。S 蛋白可以刺激机体产生中和性抗体, 此外现有的研究表明 preS1 和 preS2 多肽的免疫原性都很强。由 preS1 和 preS2 引起的特异性的细胞免疫应答可以帮助克服某些个体对 S 蛋白的免疫无应答状态<sup>[6]</sup>。HBsAg 是糖基化的主要蛋白, 具有完整的抗原性<sup>[7]</sup>。现有的 HBV 疫苗含主要的 HBsAg, 保护性免疫针对 HBsAg 99~170 位残基的主要疏水区。

#### 3.1.2. preS 多肽与肝细胞嗜性

HBV 的嗜肝性主要是由 preS 多肽与肝细胞受体之间的识别与结合介导的, 肝细胞受体结合位点可定位于 preS1(32~47) 区段。此外, preS2 多肽可与聚人血清蛋白结合, 然后利用肝细胞表现的聚人血清蛋白受体作为接头间接与肝细胞膜结合。

### 3.2. C 基因

C 基因位于 HBV 1901~2449 位核苷酸, 长 549 bp, 编码 183 个氨基酸。HBcAg 是由这 183 个氨基酸残基形成的二聚体。已知 HBcAg 的 1~149 位残基形成了一个大的  $\alpha$ -螺旋的装配区域, 其中 78~137 位残基形成刺突(spike)。150~183 位残基形成了一个 RNA 包装所需的精蛋白样区域。尽管起源于相同的基因, HBcAg 和 HBeAg 在抗原性方面不具有交叉反应性。

在 HBV 基因组中, 核心启动子(core pro-moter, CP) 有着极其重要的作用。它介导两种 RNA 即前核心

RNA(precore RNA)和前基因组 RNA(pregenomic RNA)的转录。前核心 RNA 与前基因组 RNA 是两种长度稍有不同的 3.5Kb RNA,起始位点仅相差 30 核苷酸(nt)。较长的前核心 RNA 编码产生前核心蛋白,经信号肽酶和高尔基体中的蛋白酶加工形成成熟的 e 抗原(HBeAg)分泌到细胞外。较短的前基因组 RNA 翻译产生核心抗原(HbcAg)和 P 蛋白,同时也是 HBV-DNA 复制时的模板,被 P 蛋白识别包装入核心颗粒,经逆转录产生子代 DNA<sup>[7,8]</sup>。从免疫学角度看,在所有的 HBV 蛋白成分中,HbcAg 颗粒诱导 B 细胞、T 辅助细胞和细胞毒性 T 细胞(CTL)的免疫反应最强烈。

### 3.3. X 基因

X 基因位于 HBV 1374~1835 位核苷酸,长 462 bp,编码 154 个氨基酸大小的 HBx 蛋白。HBx 蛋白的精确 X 基因编码的 HBV X 蛋白可通过反式激活的方式影响病毒基因组和宿主基因的转录。X 蛋白的一个重要作用是对肝内嘌呤和嘧啶代谢有增强作用。

HBV X 蛋白反式激活的靶序列很广泛,既有病毒自身的启动子,又有细胞基因组的启动子序列引<sup>[9]</sup>。此外,HBV X 蛋白可与抑癌基因产物 p53 结合,并使其固有的反式激活能力丧失。对于宿主细胞,p53 介导凋亡发生的能力也可被 X 蛋白抑制,因此 HBx/p53 的表达水平可能影响到 HBV 感染肝细胞凋亡与增殖的比例,是 HBV 感染的肝细胞发生恶性转化的原因之一<sup>[10]</sup>。

### 3.4. P 基因

P 基因是 HBV 最长的基因,横跨 80%的基因组,与 3 个其他的基因(表面、核心及 X 基因)重叠,位于 2307~3215 及 1~1620 位核苷酸,长约 2529 bp,含有 834~845 个密码子,编码 90 kD 的多聚酶(P)蛋白。但至今尚未发现 P 区起始的 mRNA,可能与其含量很低有关。P 蛋白是病毒复制所必需的<sup>[11]</sup>。P 主要编码具有依赖 RNA 的 DNA 聚合酶活性的 P 蛋白,对于 HBV 核衣壳的形成以及 DNA 链的复制至关重要。

## 4. HBV 生物标志物及其检测方法研究进展

目前用于研究 HBV 的生物标志物有很多种类,下文将按照生物标志物的分类进行阐述,通过研究这

些生物标志物的特征性能和应用领域,对 HBV 进行更早、更快速、更准确的检测。

### 4.1. HBV 蛋白生物标志物

蛋白类生物标志物的存在与否是检测是否感染乙肝病毒最常规的检测手段。比如国内医院最常用的乙肝五项就属于该类血清标志物。

#### 4.1.1. HBsAg

乙肝表面抗原(HBsAg)一般用于判断是否感染了乙肝病毒。乙肝表面抗原(HBsAg)是乙肝病毒的外壳蛋白,本身不具有传染性,但它的出现常伴随乙肝病毒的存在,所以它是判断机体感染 HBV 最重要的标志物之一,也是机体血清中首先出现的生物标志物。一般来说,HBsAg 阳性可见于急性乙型肝炎患者的潜伏期、急性期、慢性乙型肝炎、无症状携带者、部分肝硬化和肝癌患者的血清中。其检测的准确性将有可能直接影响到该患者的利益。所以它的检测在临床上有着极为重要的意义。

#### 4.1.2. HBsAb

HBsAb 是乙肝恢复、预后良好的血清学标志。HBsAb 是机体受 HBsAg 刺激而产生的相应抗体,它可以与 HBsAg 相结合,在体内其他免疫系统共同作用下清除病毒,以保护机体不再受 HBV 的感染。HBsAb 含量越高,机体抵抗 HBV 入侵的能力越强。所以 HBsAb 是具有特异性保护功能的中和抗体,有的 HBsAb,表明机体已产生免疫力。当 HBsAb 可以在血清中检出时,HBsAg 从血清中转阴已有 2 周左右。临床上常将 HBsAg 转阴而 HBsAb 尚未出现的时期称为“空窗”期,这时只有 HBcAb 阳性,其余的血清免疫学指标均为阴性。

总的来说,HBsAb 是疾病恢复、预后良好的血清学标志。急性乙肝患者 HBsAg 转阴后,至少有 80% 的人可以检出 HBsAb。

#### 4.1.3. HBeAg

HBeAg 是人体感染 HBV 后跟随 HBsAg 出现的第 2 个蛋白抗原标志物。它是一种可溶性蛋白,一般仅见于乙肝病毒表面抗原(HBsAg)阳性的患者,是乙肝病毒在体内复制的标志之一。以往研究认为 HBeAg 阳性,HBV-DNA 阳性是反映乙肝病毒复制的标志,

但后来发现部分 HBeAg 阴性, HBeAb 阳性的患者 HBV-DNA 为阳性, 即部分 HBeAb 阳转的患者仍存在病毒的复制。后来多项研究发现前 S1 抗原与 HBV-DNA 的检测率高度相关, 是一项十分重要的病毒复制指标<sup>[12,13]</sup>。

#### 4.1.4. HBeAb

乙肝 e 抗体(HBeAb)是人体感染乙肝病毒血清学标志物指标之一, HBeAb 阳性主要出现在无症状乙肝表面抗原携带者和慢性乙肝患者中间。这说明其体内病毒复制受到不同程度的抑制, 说明血中 HBV 减少, 传染性降低。HBeAb 是一种非保护性抗体, 只是依赖 T 淋巴细胞产生的特异性抗体。HBeAb 只有 IgG 抗体, 其亚型的相对水平差异不显著。HBeAb 在血清中出现, 常表示 HBV 复制水平逐渐趋于静息状态。但是, 在免疫功能和抗病毒药物的压力下, 常有基因组前 C/C 区的变异, 造成免疫逃逸, 对 HBV 复制失去监控, 可出现 HBeAg 阴性而 HBeAb 阳性, 血清 HBV DNA 仍有复制。因此, HBeAb 是感染性指标, 也有可能传染性指标, 这将由血清中的 HBV DNA 定性或定量来决定其传染性的强弱。

#### 4.1.5. HBcAb

HBcAb 是乙肝核心抗体的英文缩写, 它和 HBcAg 是一对相对应的抗原抗体系统。在急性 HBV 感染中, HBcAb 的产生通常在 HBsAg 出现后 3~5 周。此时, HBsAg 已经消失, HBsAb 尚未阳转。HBcAb 的检出反映乙肝病毒在复制, 无保护作用, 不能中和乙肝核心抗原。

#### 4.1.6. HBcAg

血清 HBcAg 阳性可提供肝内 HBV 合成的信息, 是病毒存在的直接标志。HBcAg 感染的肝细胞是细胞免疫效应攻击的靶细胞, 肝细胞溶解后 HBcAg 可直接释放入血, 故能直接反映肝细胞损害和病情进展的程度。HBcAg 存在于 Dane 颗粒的核心, 是 HBV 的结构蛋白, 由 HBV 基因组 C 开放读码区编码。HBcAg 指标是体内存在乙型肝炎病毒颗粒的直接标志, 而 HBsAg、HBeAg、HBeAb 等指标都是 HBV 存在的间接标志, 所以, HBcAg 测定更能反映 HBV 的存在及其复制程度, 比其他各种免疫学指标更灵敏、更特异, 比 HBeAg 强 100 倍<sup>[14]</sup>。其地位与 HBV DNA 和 DNA-P

相同。HBcAg 是乙型肝炎病毒(HBV)的核心成分, 若在血清中检出 HBcAg 则说明有 HBV 复制。

#### 4.1.7. HBcrAg

近年来, HBcrAg 作为一种新的血清学标志在患者病情的发展评价中被寄予厚望。它的主要结构是 HBcAg、HBeAg 与 p22cr(22 kDa precore protein)三种蛋白质。目前研究发现 HBcrAg 可作为预测肝细胞癌根治术后患者复发的因素, 通过测定血清 HBcrAg 和肝内共价闭合环状 DNA(cccDNA)的水平可以表明病毒的状态与肝细胞癌的复发有关, 因此可作为慢性乙肝患者 HBV 复制情况与抗病毒治疗疗效监测<sup>[15,16]</sup>。

## 4.2. HBV 蛋白生物标志物检测方法研究进展

### 4.2.1. ELISA

ELISA, 全称是酶联免疫吸附剂测定(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA), 以灵敏度高、特异性强、重复好为突出优点, 对 HBsAg 的检测灵敏度可达 0.5 ng/ml。目前国内成熟的 ELISA 肝炎试剂, 已被卫生部临床检验中心作为标准与美国 ABBOTT 试剂在灵敏度、特异性上都非常接近, 所以 ELISA 被广泛应用于乙肝病毒蛋白标志物的检测。

### 4.2.2. 胶体金免疫层析法

该法是在 ELISA 基础上发展起来的一种检测技术, 它用胶体金标记抗原、抗体后以层析方法进行检测, 突出优点为快速、试剂便于保存、检测不需要特殊设备并可以单份检测, 比较适用于基层医疗单位和标本初筛。目前已有成熟的胶体金试纸条如 HCG 金标纸条广泛应用于临床检测。在乙型肝炎重要标志物之一的 HBsAg 检测中, 国外较好的金标试纸的检测灵敏度已接近 ELISA, 国内也有较成熟的胶体金试纸条广泛应用, 该法在 HBV 蛋白生物标志物的检测中具有非常广阔的前景。

### 4.2.3. 反向被动血凝

在临床上反向被动血凝方法检测 HBV 出曾在相当一段时间占据了重要地位, 直至被 ELISA 方法完全取代。其用表面抗体致敏 O 型红细胞, 将病人血清连续二倍稀释与其反应一定时间后肉眼观察凝集现象判断表面抗原滴度。此法的特别之处在于可对表面抗原作相对定量, 因此颇受临床医师欢迎, 但操作复杂

是其缺点。

#### 4.2.4. 免疫荧光技术

免疫荧光技术不受自然荧光干扰, 具有灵敏度高、特异性强、标准曲线范围宽、标记物制备简便、存储时间长、无放射性污染、检测重复性好、操作流程短和应用范围广泛等优点, 成为最有潜力的一种标记免疫分析方法。TRFIA 是以三价稀土离子及其螯合剂作为示踪物, 如铕( $\text{Eu}^{3+}$ )、铽( $\text{Te}^{3+}$ )及钐( $\text{Sm}^{3+}$ )、镝( $\text{De}^{3+}$ )等代替传统的荧光物质、放射性同位素、酶和化学发光物质, 来标记抗体、抗原等, 待反应体系发生后, 用时间分辨荧光仪测定最后产物中的荧光强度, 根据荧光强度和相对荧光强度比值, 判断反应体系中分析物的浓度, 以达到定量分析的目的。

该技术可以在急性乙肝早期能及早检出 HBsAg, 确认 HBV 感染, 几乎能与 preS 同时检出, 在病程观察中大大缩短“窗口期”时间, 还可发现低浓度 HBsAg 携带者, 并可以解决 ELISA 法因钩状效应而导致的漏检。

#### 4.2.5. 微粒子酶免法(MEIA)

MEIA 是近年来新发展起来的一种新的抗原抗体检测技术。该方法利用微粒内因子与待测物形成微粒内因子复合物后, 与碱性磷酸酶共轭化合物结合成微粒内因子共轭复合物, 再与底物反应生成带荧光的产物而被测定。临床上用雅培 AXSYM 的 MEIA 法测定乙肝病毒血清学标志物是公认参考法, 特点是: 全自动, 操作时环境不易被污染, 但由于仪器和试剂成本高, 在基层医院尚不能普及。

### 4.3. 核酸生物标志物

核酸类 HBV-DNA 和 cccDNA 的存在是乙肝病毒复制的一个重要标志, 近年来对其的检测开展的越来越多。核酸类生物标志物对比蛋白类生物标志物的优点如下:

- 1) 检测方法快速、高效。一般可用 PCR 的方法进行检测。
- 2) 在病毒感染的窗口期就可检测出来, 而乙肝表面抗原等蛋白类则要在感染 1~2 周之后才可以被检测出来。
- 3) 检测 HBV-DNA 和 cccDNA 是评价病毒药物疗

效和耐药性的金指标。

#### 4.3.1. HBV-DNA

检测 HBV-DNA 是十分重要的血清学标志。CHB 患者中, HBV DNA 可整合到染色体上或游离于血清中。HBV-DNA 还可作为判定 HBV 药物疗效的一个极有意义的临床指标。

HBV-DNA 即是乙肝病毒的脱氧核糖核酸(即乙肝病毒基因)。HBV-DNA 是 HBV 感染最直接、特异性强和灵敏性高的指标, HBV-DNA 阳性, 提示 HBV 复制和有传染性。HBV-DNA 越高表示病毒复制越厉害, 传染性强。HBV-DNA 可采用核酸杂交、PCR 等方法进行检测。定量检查就是检验乙肝病毒在血液中的含量。通过乙肝病毒含量的检测, 可以了解患者体内的病毒含量, 病情发展状况, 对患者的治疗有很好的指导作用。

#### 4.3.2. cccDNA

细胞外乙型肝炎病毒 DNA 是一种松弛环状的双链 DNA(relaxed circular DNA, rcDNA)分子。cccDNA 是乙肝病毒前基因组 RNA 复制的原始模板, 虽然其含量较少, 每个肝细胞内只有约 5~50 个拷贝, 但对乙肝病毒的复制以及感染状态的建立具有十分重要的意义。

HBV 病毒进入细胞后, 在胞浆内脱壳, 松弛环状 DNA(rcDNA)正链在 DNA 聚合酶的作用下形成全长的 rcDNA。rcDNA 被转运至核内构象发生改变形成 cccDNA, 作为 HBV 部分基因 mRNA 和前基因组 RNA 的合成模板。新合成的双链 DNA 中的正链大多不完整, 包含完整或部分正链的核衣壳包装进病毒胞膜, 运出细胞成为成熟的病毒体, 但也可在胞浆内脱壳形成 rcDNA 被转运至核内以补充 cccDNA 的量, 示踪试验证实这是细胞核内 cccDNA 扩增池的主要来源。cccDNA 是乙肝病毒复制中重要的中间产物, 一旦它在肝细胞核内形成, 就具有高度的稳定性, 可长期存在于肝细胞内, 不但起着原始模板作用, 而且还很难完全清除。只有清除了细胞核内的 cccDNA, 才能彻底消除乙肝患者病毒携带状态, 是抗病毒治疗的目标。如患者体内检测出 cccDNA 说明 HBV 有再活化的高风险<sup>[17,18]</sup>。

在血清 HBsAg 和 HBV-DNA 均阴性肝癌患者的

癌组织及癌旁组织中检测到 cccDNA, 说明血清 HBsAg 和 HBV DNA 均阴性不能真实反映患者的 HBV 感染情况。有报道慢性乙肝患者经抗病毒治疗后, 一些 HBsAg 转阴、血清 HBV-DNA 在检测限以下或者 HBeAg 发生血清学转化的患者, 其肝组织中仍可检测到 cccDNA 和 HBV-DNA, 且以 cccDNA 占主要形式<sup>[19-22]</sup>, 表明肝组织内 cccDNA 的定量检测有重要临床意义, 可评价: ①抗病毒药物疗效及持续应答情况; ②HBV 感染状态及其传染性指标<sup>[23]</sup>; ③可否引发肝癌; ④是否肝外组织感染的客观指标<sup>[24,25]</sup>; ⑤肝移植后肝脏是否再感染的指标<sup>[26-28]</sup>。

#### 4.4. HBV 核酸生物标志物检测方法研究进展

荧光定量 PCR 法是近年来在医学检验普遍采用的一种核酸类生物标志物的定量检测方法, 该方法主要是在反应体系中引入了标记探针, 探针的 5'端采用荧光基团标记, 3'端采用荧光淬灭基团标记, 在未扩增时特异性模板数量较少或没有, 故而探针大多以游离形式存在, 此时淬灭基团与荧光基团较为接近, 从而产生封闭作用, 整个反应体系中没有荧光产生或有较小的荧光本底。PCR 扩增后, 阳性标本中有大量的特异性模板生成, 探针与其模板特异性结合, 此时淬灭基团与荧光基团之间的距离变远, 封闭作用减弱, DNA 聚合酶的酶切活性, 将探针的淬灭基团切除其封闭作用完全丧失, 当紫外光照射时, 荧光基团发出荧光根据荧光的强度可以判断病毒的原始浓度。该方法具有快速、灵敏、准确等特点, 是 HBV 核酸生物标志物最常用的检测方法。

#### 5. 小结

乙型肝炎病毒性肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)引起的, 目前是一种世界性传染性疾病, 全世界无症状乙型肝炎病毒携带者(HBsAg 携带者)超过 3.5 亿。因此, 乙肝的检测、预防和治疗显得尤为重要。在乙型肝炎病毒感染的早期能快速、准确、高效的将其检测出来对治疗有非常大的帮助。因此, 从人群和病患的实际情况出发, 根据乙型肝炎病毒生物标志物的不同特点, 选择不同的检测方法和商业试剂盒进行病毒检测, 可以避免因检测方法和试剂的误用而影响检测效果。同时, 根据不同乙型肝炎病毒生物标志物研制不同类型的标准物质

或标准品, 对乙型肝炎病毒检测方法和商业试剂盒进行评价, 以避免误检、漏检和检测结果不准的情况发生, 从而更好地为患者服务。

#### 参考文献 (References)

- [1] 吴簧, 沈佐君 (2010) 乙型肝炎病毒基因型的中国国内研究进展. *国际检验医学杂志*, **7**, 703-704.
- [2] 梅玉峰, 黄敏, 陈丽娟 (2010) HBV-DNA 阳性乙肝感染者血清学标志物临床分析. *国际检验医学杂志*, **9**, 1004-1005.
- [3] 彭文伟 (1997) 病毒性肝炎研究. 广东科技出版社, 广州, 1.
- [4] 田华, 王淑琴, 高建英 (2001) FQ-PCR 检测乙型肝炎患者血清 HBV-DNA. *上海医学检验杂志*, **6**, 363.
- [5] 高寿征 (1993) 病毒性肝炎. 人民军医出版社, 北京, 1.
- [6] Lok, A.S.F. (2000) Hepatitis B infection: Pathogenesis and management. *Journal of Hepatology*, **32**, 89.
- [7] 何长伦, 许家璋, 畅志国等 (1998) 单一庚型肝炎病毒感染的临床和病理. *南京部队医药*, **4**, 8-10.
- [8] 成萍, 尤忠胜, 孔玉英等 (1999) 乙型肝炎病毒的核心启动子各功能区功能的研究. *生物化学与生物物理学报*, **5**, 577.
- [9] Reifenberg, K., Lohler, J., Puddollek, H.P., et al. (1997) Long-term expression of the hepatitis B virus core-e-and x protein does not cause pathologic changes in transgenic mice. *Journal of Hepatology*, **26**, 119.
- [10] Wang, X.W., Gibson, M.K., Vermulen, W., et al. (1995) Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Research*, **23**, 53.
- [11] Prince, P., Hirschman, S.Z. and Garfinkel, E. (1980) DNA cloned from the ayw subtype of hepatitis B virus. *Journal of Medical Virology*, **6**, 139-145.
- [12] Chemin, I., Baginski, I., Petit, M.A., et al. (1991) Correlation between HBV-DNA detection by polymerase chain reaction and Pre-S1 antigenemia in symptomatic and asymptomatic hepatitis B virus infections. *Journal of Medical Virology*, **33**, 51-57.
- [13] 李琴, 孙桂珍, 魏玉香等 (2004) Pre-S1 蛋白与乙型肝炎病毒 DNA 和 e 抗原在诊断乙型肝炎病毒复制时的对比性研究. *中华肝脏病杂志*, **12**, 134-136.
- [14] Bonino, F. and Brunetto M.R. (1993) Hepatitis B virus heterogeneity, one of many factors influencing the severity of hepatitis B. *Journal of Hepatology*, **18**, 5-8.
- [15] Suzuki, F., Miyakoshi, H., Kobayashi, M., et al. (2009) Correlation between serum hepatitis B virus core-related antigen and intrahepatic covalently closed circular DNA in chronic hepatitis B patients. *Journal of Medical Virology*, **81**, 27-33.
- [16] Tanaka, E., Matsumoto, A. and Yoshizawa, K. (2008) Hepatitis B core-related antigen assay is useful for monitoring the antiviral effects of nucleoside analogue therapy. *Inter virol.*, **1**, 3-6.
- [17] Guo, H.T., Jiang, D., Zhou, T.L., et al. (2007) Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: An intermediate of covalently closed circular DNA formation. *Journal of Virology*, **81**, 12472-12484.
- [18] 吴凤婷, 吕其军 (2007) 肝病患者血清中 HBVcccDNA 检测的临床意义. *肝脏*, **4**, 246-248.
- [19] Pollicino, T., Squadrito, G., Cerenzir, G., et al. (2004) Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. *Gastroenterology*, **126**, 102-110.
- [20] Yuen, M.F., Wong, D.K., Sablon, E., et al. (2004) HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: Virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology*, **39**, 1694-1701.
- [21] Werle-Lapostolle, B., Bowden, S., Locarnini, S., et al. (2004) Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*, **126**, 1750-1758.

- [22] Yuen, M.F., Wong, D.K., Fung, J., et al. (2008) HBsAg sero-clearance in chronic hepatitis B in Asian patients: Replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, **135**, 1192-1199.
- [23] Chen, Y., Sze, J. and He, M.L. (2004) HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World Journal of Gastroenterology*, **10**, 82-85.
- [24] Lu, L., Zhang, Y.H., Yueng, Y.H., et al. (2009) Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *Journal of Viral Hepatitis*, **16**, 104-112.
- [25] Takkenberg, R.B., Zaaijer, H.L., Molenkamp, R., et al. (2009) Validation of a sensitive and specific real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in plasma of chronic hepatitis B patients. *Journal of Medical Virology*, **81**, 988-995.
- [26] Faria, L.C., Gigou, M., Roque-Afonso, A.M., et al. (2008) Hepatocellular carcinoma is associated with an increased risk of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology*, **134**, 1890-1899.
- [27] Lenci, I., Marcuccilli, F., Tisone, G., et al. (2010) Total and covalently closed circular DNA detection in liver tissue of long-term survivors transplanted for HBV-related cirrhosis. *Digestive and Liver Disease*, **42**, 578-584.
- [28] 中华医学会肝病分会, 中华医学会感染病学分会 (2006) 慢性乙型肝炎防治指南. *中国病原生物学杂志*, **1**, 67-76.